

Полевщикова Елена Евгеньевна

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
АЛЬБУМИНОВОГО И ЦИТОЗОЛЬНОГО ДИАЛИЗА
НА АППАРАТЕ «БИОИСКУССТВЕННАЯ ПЕЧЕНЬ»**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2017

Работа выполнена на кафедре биологической химии (биохимии) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Рябинин Вячеслав Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Лунёва Светлана Николаевна – доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, клинико-экспериментальный лабораторный отдел, руководитель

Никулина Дина Максимовна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «28» сентября 2017 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседаний ученого совета (аудитория № 205А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке имени Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
д-р биол. наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Нарушение функции печени возникает при различных патологических состояниях: печеночной недостаточности, ожоговой болезни, радиационных поражениях, вирусных гепатитах и др. – и сопровождается выраженными метаболическими расстройствами с развитием токсемического синдрома (Плеханов А. Н., Товаршинов А. И. Современные подходы к диагностике и лечению печеночной недостаточности (обзор литературы) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2016. Т. 1. № 4 (110). С. 156–161). Количество пациентов с тяжелым течением и хроническими формами заболеваний печени, приводящими к прогрессирующему развитию печеночной недостаточности, постоянно возрастает (Искра А. И., Лепехова С. А. Перспектива использования биотехнологий для коррекции печеночной недостаточности (обзор литературы) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2014. Вып. № 1 (95). С. 112–119; Blachier M. et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data // Journal of hepatology. 2013. Т. 58. № 3. P. 593–608). Использование стандартных терапевтических приемов при лечении печеночной недостаточности не позволяет достичь удовлетворительных результатов, и смертность сохраняется на уровне 80–90% (Tritto G., Davies N. A., Jalan R. Liver replacement therapy // Crit. Care Med. 2012. Vol. 33, № 1. P. 70–79).

Значительная часть методов лечения эндо- и экзогенных интоксикаций у человека основана на методах экстракорпоральной детоксикации (гемодиализ, гемосорбция, плазмоферез и пр.), среди которых особое значение имеют системы типа «вспомогательная искусственная печень» (Рябинин В. Е. Проблемы и перспективы создания экстракорпоральных систем поддержки функционального состояния печени // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61, № 5. С. 545–559). Обеспечивая незаменимые функции печени, эти системы могут поддерживать жизнь пациента до пересадки печени или до восстановления функции собственной печени (Кутепов Д. Е. Использование экстракорпоральных методов лечения печеночной недостаточности // Казанский медицинский журнал. 2014. Т. 95, № 1. С. 75–79; Zheng Z. et al. Artificial and bioartificial liver support systems for acute and acute-on-chronic hepatic failure: A meta-analysis and meta-regression // Exp. Ther. Med. 2013. Vol. 6, № 4. P. 929–936). Однако известная ограниченность и недостаточная эффективность этих методов лечения требуют их усовершенствования и разработки новых, патогенетически обоснованных, способов детоксикации и нормализации обменных процессов (Nevens F., Laleman W. Artificial liver support devices as treatment option for liver failure // Clin. Gastroenterol. 2012. Vol. 26, № 1. P. 17–26).

Таким образом, разработка новых и совершенствование существующих методов экстракорпоральной детоксикации сохраняют свою актуальность. При создании новых систем экстракорпоральной детоксикации внимание большинства разработчиков и исследователей сосредоточено, прежде всего, на оценке эффективности и безопасности разрабатываемого метода. Сами исследования, как правило, ограничены рамками действующих протоколов доклинических и клинических испытаний. Результатом такого подхода является недостаток сведений о механизмах достижения терапевтического эффекта. Учитывая актуальность и сложность проблем, возникающих при создании экстракорпоральных систем поддержки печени, в настоящее время требуется координация деятельности специалистов, занимающихся биохимией, клеточной биологией и лечением печеночной недостаточности, с целью разработки и своевременного внедрения доступных методов лечения. Теоретической базой, обеспечивающей развитие в этом направлении, должны быть исследования, которые позволят не только оценить эффективность и безопасность используемых методов экстракорпоральной очистки крови,

но и детализировать механизмы достижения терапевтического эффекта, что будет способствовать расширению возможностей по созданию принципиально новых подходов в эфферентных методах терапии.

Цель исследования. Установить механизмы возмещения детоксицирующей и метаболической функций печени при использовании цитозольного и альбуминового диализа на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень» в модельном эксперименте и клинических испытаниях.

Задачи исследования:

1. Изучить динамику изменения концентраций аммиака и мочевины в экстракорпоральном контуре аппарата «Биоискусственная печень» в ходе модельного эксперимента при использовании в качестве биодиализирующего раствора цитозоля печени с микросомальной и митохондриальной фракциями.

2. Установить динамику изменения концентраций анилина и пара-аминофенола в экстракорпоральном контуре в ходе модельного эксперимента при использовании в качестве биодиализирующего раствора цитозоля печени с микросомальной и митохондриальной фракциями.

3. Определить динамику изменения концентраций аммиака, салицилата натрия, 2,4-динитрофенола, молекул средней массы и анилина в модельном и диализном растворах при альбуминовом и плазменном диализе в условиях модельного эксперимента на аппарате «Биоискусственная печень».

4. Провести сравнительный анализ эффективности удаления маркерных токсических соединений с помощью альбуминового и цитозольного диализа при использовании низкопоточных и высокопоточных диализаторов на аппарате «Биоискусственная печень» в условиях модельного эксперимента.

5. Оценить эффективность альбуминового диализа на аппарате «Биоискусственная печень» для коррекции метаболических нарушений у пациентов с острой печеночной недостаточностью.

Научная новизна. Впервые охарактеризованы механизмы и эффективность обезвреживания аммиака и анилина на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень» («БИП») при использовании в качестве диализирующего раствора цитозоля печени. Охарактеризованы механизмы и эффективность элиминации различных гидрофильных и гидрофобных веществ на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень» при альбуминовом диализе.

Впервые изучены возможность и эффективность очистки (десорбции) раствора альбумина после проведенного диализа на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень» с применением углеродных гемосорбентов, способствующей повышению акцепторной способности альбумина.

Впервые в условиях модельного эксперимента использован метод диализа с донорской плазмой в качестве диализирующего раствора и показана его эффективность на экспериментальном промышленном образце аппарата «БИП», сравнивая с альбуминовым диализом.

Впервые проведены модельные исследования, позволившие изучить механизмы различных режимов экстракорпоральной детоксикации на аппарате «БИП»: сопоставлены низкопоточный и высокопоточный альбуминовый и цитозольный диализ.

По результатам клинко-лабораторного мониторинга функционального состояния печени получены новые данные о терапевтической эффективности использования 10 %-го раствора альбумина на экспериментальном промышленном образце аппарата «БИП» при лечении больных с острой печеночной недостаточностью (ОПН).

Впервые показана возможность использования лиофилизированного цитозоля печени свиньи после его длительного хранения в качестве диализирующего раствора на аппарате «БИП» для лечения больных с ОПН.

Впервые получены данные о состоянии микросомальной системы цитозоля печени при использовании его в качестве диализирующего раствора на аппарате «Б ИП» в зависимости от длительности процедуры диализа и сроков хранения цитозоля.

Теоретическая и практическая значимость работы. По результатам модельных экспериментов установлены механизмы возмещения детоксицирующей и метаболической функций печени при использовании цитозольного и альбуминового диализа на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень». Дано экспериментальное обоснование возможности и эффективности использования цитозоля печени, раствора человеческого альбумина и донорской плазмы в качестве диализирующих растворов для экспериментального промышленного образца аппарата «Б ИП».

Результаты проведенных клинических испытаний аппарата «Б ИП» свидетельствуют об эффективности его использования при лечении пациентов с печеночной недостаточностью и возможности применения при терапии ОПН в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Полученные клинко-экспериментальные данные являются основой для разработки multifunctional аппаратов для экстракорпоральной детоксикации и нормализации обмена веществ.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено в соответствии с плановой тематикой научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. В работе представлены результаты экспериментального и клинического разделов исследования.

Экспериментальный раздел работы включает в себя результаты, полученные в серии модельных экспериментов на экспериментальном промышленном образце аппарата «Биоискусственная печень». Клинический раздел работы проводили на базе областной клинической больницы г. Челябинска в отделении реанимации и интенсивной терапии (2009–2011 гг.) в соответствии с действующими нормативными документами (ГОСТ Р ИСО 14155-1-2008 Руководство по проведению клинических испытаний медицинских изделий; ГОСТ Р 52379-2005 Национальный стандарт Российской Федерации Надлежащая клиническая практика. М., 2005).

Для достижения цели и решения поставленных задач использовались биохимические, клинко-лабораторные, фармакокинетические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Возмещение мочевинообразовательной и детоксицирующей функций печени при цитозольном диализе на аппарате «Биоискусственная печень» реализуется за счет ферментов орнитинового цикла и микросомального окисления, а при альбуминовом и плазменном диализе – за счет связывания с белками в диализном контуре аппарата «Биоискусственная печень».

2. Метаболическая активность цитозоля с микросомальной и митохондриальной фракциями выше при использовании низкопоточных диализаторов, а эффективность связывания токсических веществ альбумином выше при использовании высокопоточных диализаторов.

3. Клинические исследования на экспериментальном образце аппарата «Биоискусственная печень» продемонстрировали высокую эффективность альбуминового диализа в коррекции нарушений азотистого, пигментного и углеводного обмена при острой печеночной недостаточности.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора. Степень достоверности полученных результатов диссертации подтверждается их теоретическим анализом, личным участием автора во всех экспериментах, проведенных с помощью современных методик, сертифицированного оборудования и реактивов; актами внедрения результатов работы в учебный процесс и проверки первичной документации; статистической обработкой полученных данных и публикацией материалов диссертации в статьях, докладах на значительном числе научных конференций.

Основные положения работы изложены и представлены на II Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003); межрегиональной конференции биохимиков Урала, Западной Сибири и Поволжья «Биохимия: от исследования молекулярных механизмов – до внедрения в клиническую практику и производство» (Оренбург, 2003); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 50-летию ЧГМА «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины» (Чита, 2003); II итоговой научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию образования ЧелГМА (Челябинск, 2004); Двенадцатой Российской конференции «Гепатология сегодня» (Москва, 2007); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине» (Курган, 2007); Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009); Международной интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2012); I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); Российской научно-практической конференции «Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015).

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных лично автором на кафедре биохимии Южно-Уральского государственного медицинского университета. Личный вклад автора в настоящую работу состоит в постановке целей и задач (совместно с профессором, д-ром биол. наук В. Е. Рябининым), разработке экспериментального образца аппарата «БИП», его режимов и характеристик детоксикационных модулей (совместно с профессором, д-ром биол. наук В. Е. Рябининым, В. И. Супруном, А. Г. Томиловым, А. П. Егоровым, В. А. Куксой), проведении модельных экспериментов на аппарате «БИП» (совместно с профессором, д-ром биол. наук В. Е. Рябининым, канд. биол. наук С. И. Гротовым), проведении обследования пациентов и сборе первичного материала (совместно с профессором, д-ром биол. наук В. Е. Рябининым, д-ром мед. наук Е. Л. Куренковым, канд. мед. наук А. Ю. Тюриным, канд. мед. наук И. И. Долматовым), проведении клинических исследований на аппарате «БИП» (совместно с профессором, д-ром биол. наук В. Е. Рябининым, канд. мед. наук А. Ю. Тюриным), выполнении лабораторного этапа исследований (совместно с канд. биол. наук С. А. Пушкаревым, канд. мед. наук Д. А. Козочкиным, П. Н. Попковым, С. Н. Краснопеевой, А. М. Малышевой, А. А. Стасюком, А. Ю. Дубасовым, Л. Ю. Сухановой, Р. И. Мухаметжановой, М. А. Соколовым), обработке, анализе и обобщении полученных результатов, статистической обработке первичных данных, написании и оформлении рукописи диссертации.

Работа выполнена при поддержке:

1) гранта федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. «Разработка и создание мультифункционального аппарата «Биоискусственная печень» с биоинженерными 3D клеточными конструкциями» (соглашение о предоставлении гранта № 8275 от 23.10.2012);

2) программы «Старт 2010» Фонда содействия развитию малых предприятий в научно-технической сфере, проект «Разработка конструктивных и эксплуатационных параметров многофункционального аппарата для очищения крови с экспериментальным изучением эффективности его функционирования» (государственный контракт № 7564р/10391 от 26.02.2010);

3) гранта Российского гуманитарного научного фонда «Новые системы искусственного жизнеобеспечения и клеточные технологии в оказании медицинской помощи населению Челябинской области» (2009–2010 гг.).

Внедрение результатов исследования в практику. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр биологической химии (биохимии), химии фармацевтического факультета Южно-Уральского государственного медицинского университета; кафедр биологической химии, общей хирургии Башкирского государственного медицинского университета. Материалы диссертационной работы используются в практической деятельности ГБУЗ «Областная клиническая больница № 3» (г. Челябинск).

Публикации. Соискатель имеет 27 опубликованных работ, из них по теме диссертации – 21 научная работа общим объемом 53 страницы, в том числе 5 статей в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций. Соискатель имеет 1 патент на полезную модель. 10 научных работ опубликованы в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных исследований и обсуждения результатов, выводов. Библиографический указатель включает 207 источников: 92 – на русском языке и 115 – на иностранных. Работа содержит 25 таблиц, 10 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В настоящем исследовании были изучены механизмы детоксикации при использовании аппарата «Биоискусственная печень» («БИП-01») – экспериментального промышленного образца, разработанного и изготовленного ООО «Миасский завод медицинского оборудования», г. Миасс, Россия, и кафедрой общей химии/биохимии Южно-Уральского государственного медицинского университета, г. Челябинск. Аппарат предназначен для проведения экстракорпорального очищения крови в случаях ОПН методами плазмосорбции, альбуминовой и цитозольной детоксикации (Рябинин В. Е., Полевщикова Е. Е. Аппарат для диализа. Патент на полезную модель № 56191 РФ. 10.09.2006; Рябинин В. Е., Полевщикова Е. Е., Супрун В. И., Егоров А. П. Аппарат для альбуминовой и цитозольной детоксикации // Медицинская техника. 2014. № 3. С. 14–17). «БИП» состоит из перфузионного блока, гемодиализатора, стандартных магистралей для транспорта крови и диализирующего раствора (ДР), биореактора с устройством для подогрева и перемешивания.

Принцип экстракорпоральной терапии на аппарате «БИП» заключается в следующем: диализирующий раствор подают на гемодиализатор по разъемам для диализной жидкости по принципу рециркуляции в замкнутом контуре, где он контактирует через полупроницаемую мембрану диализатора с модельным раствором (МР) или с кровью пациента (в клинических испытаниях) в течение 2–3 часов. В качестве ДР в исследованиях использовали свежеприготовленный цитозоль печени свиньи, свежеприготовленный цитозоль печени крысы, 10 %-й раствор человеческого альбумина (ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия), донорскую плазму (ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия). Для восстановления акцепторной способности раствор альбумина пропускали через колонки с углеродным гемосорбентом на основе сферических карбонитратов СКН-1 («Гемопласт», Россия). В экспериментах использовали низкопоточные Hemoflow F3, F4 (Fresenius, Германия) гемодиализаторы; высокопоточные Helixone FX40, Hemoflow F10 (Fresenius, Германия) и REXEED-21UX (Asahi, Япония) гемодиализаторы.

В экспериментальной части работы (2001–2016 гг.) выделено несколько серий модельных экспериментов: альбуминовый диализ с использованием углеродных сорбентов; диализ с использованием донорской плазмы в качестве диализирующего раствора; альбуминовый диализ в низкотоочном и высокотоочном режимах; цитозольный диализ в низкотоочном и высокотоочном режимах; исследование биотрансформирующей и детоксицирующей способности цитозоля печени в экстракорпоральном контуре.

Для имитации интоксикации в модельный раствор (0,9%-й NaCl или донорская плазма) добавляли индикаторные вещества: аммиак (2 ммоль/л; 1 ммоль/л), анилин (6 ммоль/л; 3 ммоль/л), 2,4-динитрофенол (5 ммоль/л) и салицилат натрия (3,625 ммоль/л).

Отбор проб модельного раствора и диализирующего раствора в ходе модельных экспериментов осуществляли через определенные промежутки времени (исходный уровень, 30, 60, 120, 180 минут от начала процедуры) для выявления динамики изменения концентраций веществ эндогенного и экзогенного происхождения.

Содержание уровня аммиака определяли двумя методами: в донорской крови (плазме) использовали фотометрический метод А. Л. Белкина и Л. П. Осадчей (Белкин А. Л., Осадчая Л. П. Определение концентрации аммиака в небольших количествах крови // Лабораторное дело. 1977. № 3. С. 177); в цитозоле печени определение проводили ферментным глутаматдегидрогеназным методом, используя набор реактивов Monotest® Ammonia Enzymatic UV-method фирмы Boehringer Mannheim (Австрия). Содержание анилина определяли экстракционным спектрофотометрическим методом (Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. 343 с.). Скорость п-гидроксилирования анилина определяли по количеству образовавшегося п-аминофенола (Карузина И. И., Арчаков А. И. Выделение микросомной фракции печени и характеристика её окислительных систем // Современные методы в биохимии. – Москва, 1977. – С. 49-62). Определение уровня молекул средней массы проводили по Н. И. Габриэлян (Габриэлян Н. И., Липатова В. И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лабораторное дело. 1984. № 3. С. 138–140). С помощью спектрофотометрических методов определяли концентрацию 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) (Шорманов В. К. Экстракционно-фотометрическое определение нитрофенолов в биологических жидкостях // Журнал аналитической химии. 2002. Т. 57, № 2. С. 130–135) и концентрацию салицилата натрия (Farid N. A., Born G. S., Kessler W. V. et al. Improved colorimetric determination of salicylic acid and its metabolites in urine // Clinical chemistry. 1975. Vol. 21, № 8. С. 1167–1168).

Цитозоль печени с микросомальной и митохондриальной фракциями готовили по оригинальной методике с использованием свиной и крысиной печени (Рябинин В. Е., Асылгужин М. М., Уставщиков С. С. Материал В. Е. Рябинина для искусственной печени, способ его использования и искусственная печень : пат. 2135194 Российская Федерация. Заявл. 17.09.1996; опубл. 27.08.1999).

Функциональную активность цитозоля печени, используемого в качестве ДР на аппарате «БИП», оценивали, измеряя через определенные промежутки времени активности деметилазы диметиланилина, 2,6-дихлорфенолиндифенолредуктазы (Карузина И. И., Арчаков А. И. Выделение микросомной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. М., 1977. С. 49–62), аланинаминотрансферазы (АЛТ) (набор реагентов «Трансаминаза-АЛТ-Ново», «Вектор-Бест», Россия). Также контролировали уровень общего белка и мочевины (Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.).

Клинический раздел работы (2009–2011 гг.) выполнен на базе ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» в отделении реанимации и интенсивной терапии. В работе представлены результаты проспективного нерандомизированного открытого клинического исследования экстракорпорального метода лечения на экспериментальном

промышленном образце аппарата «БВП» (ООО «МЗМО», Россия, г. Миасс) 25 пациентов с диагнозом «острая печеночная недостаточность» различной этиологии.

Дизайн исследования – клиническое исследование в одной группе (single group design). Исследование одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета как соответствующее этическим нормам. Все пациенты дали информированное согласие на проведение экстракорпорального лечения и использование полученных клиничко-лабораторных результатов в научном исследовании. Лечение методом альбуминового диализа на экспериментальном образце аппарата «БВП» было проведено 25 пациентам с ОПН различной этиологии в возрасте 22–68 лет; среди них 16 лиц женского пола, 9 – мужского пола; с ОПН алкогольной этиологии – 11, лекарственной этиологии – 8, вирусной этиологии – 2, смешанного генеза – 4 человека.

Критериями включения являлись: 1) пациенты с установленным в условиях стационарного обследования диагнозом острой и хронической печеночной недостаточности, с острыми токсическими и алкогольными гепатитами, фиброзом и циррозом печени с развитием печеночно-клеточной недостаточности, подтвержденной клиничко-лабораторными данными; 2) пациенты с прогрессирующим (т. е. неуклонно нарастающим по выраженности жалоб и ухудшению клиничко-лабораторных данных в последний год или 2–3 года) течением хронической печеночной недостаточности и цирроза печени.

Критериями исключения из исследования служили: 1) несоответствие критериям включения; 2) отсутствие добровольного информированного согласия на участие в исследовании и/или отказ от подписания информированного согласия; 3) беременность и период лактации; 4) участие в любых других клинических испытаниях в период последних 6 месяцев; 5) больные в терминальном состоянии; 6) психоневрологические заболевания; 7) нестабильная гемодинамика, требующая инфузионной, метаболической и лекарственной поддержки, наличие продолжающихся кровотечений; 8) отказ больного от проведения терапии на любом этапе; 9) возникновение интеркуррентных заболеваний, не связанных с проводимой терапией, но влияющих на состояние больного, в том числе при воздействии внешних факторов (заболевания травматического генеза).

Все пациенты получали базовую инфузионно-трансфузионную терапию. Подключение пациентов к экстракорпоральному контуру осуществляли путем вено-венозного шунтирования двухпросветным катетером с катетеризацией верхней полой вены через подключичный или яремный доступ. Длительность процедуры экстракорпоральной терапии на аппарате «БВП» составляла 1–3 часа. Контроль биохимических маркеров повреждения печени осуществляли до и после сеанса для оценки эффективности проводимой терапии. В сыворотке крови пациентов определяли следующие биохимические показатели: активность трансаминаз АЛТ («Трансаминаза-АЛТ-Ново», «Вектор-бест», Россия) и АСТ («Трансаминаза-АСТ-Ново», «Вектор-бест», Россия); активность ГГТП («Гамма-ГТ-Ново», «Вектор-бест», Россия); активность ЛДГ («ЛДГ-УФ-Ново», «Вектор-бест», Россия); активность щелочной фосфатазы («Щелочная фосфатаза-Ново», «Вектор-бест», Россия); активность амилазы («Амилаза-Ново-1», «Вектор-бест», Россия); активность АХЭ («Холинэстераза-Ново», «Вектор-бест», Россия); активность КФК («Креатинкиназа-Ново», «Вектор-бест», Россия); уровень билирубина («Билирубин-Ново», «Вектор-бест», Россия); концентрацию креатинина («Креатинин-Ново», «Вектор-бест», Россия); концентрацию аммиака (Белкин А. Л., Осадчая Л. П. Определение концентрации аммиака в небольших количествах крови // Лабораторное дело. 1977. № 3. С. 177); концентрацию мочевины («Новокарб», «Вектор-бест», Россия); содержание общего белка (анализатор Ultra фирмы KONE, Финляндия); содержание альбумина (анализатор Beckman, США); уровень молекул средней массы (Габриэлян Н. И., Липатова В. И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей

// Лабораторное дело. 1984. № 3. С. 138–140); содержание холестерина («Новохол», «Вектор-бест», Россия); концентрацию глюкозы («Глюкоза-УФ-Ново», «Вектор-бест», Россия) и уровень электролитов (анализатор Beckman, США).

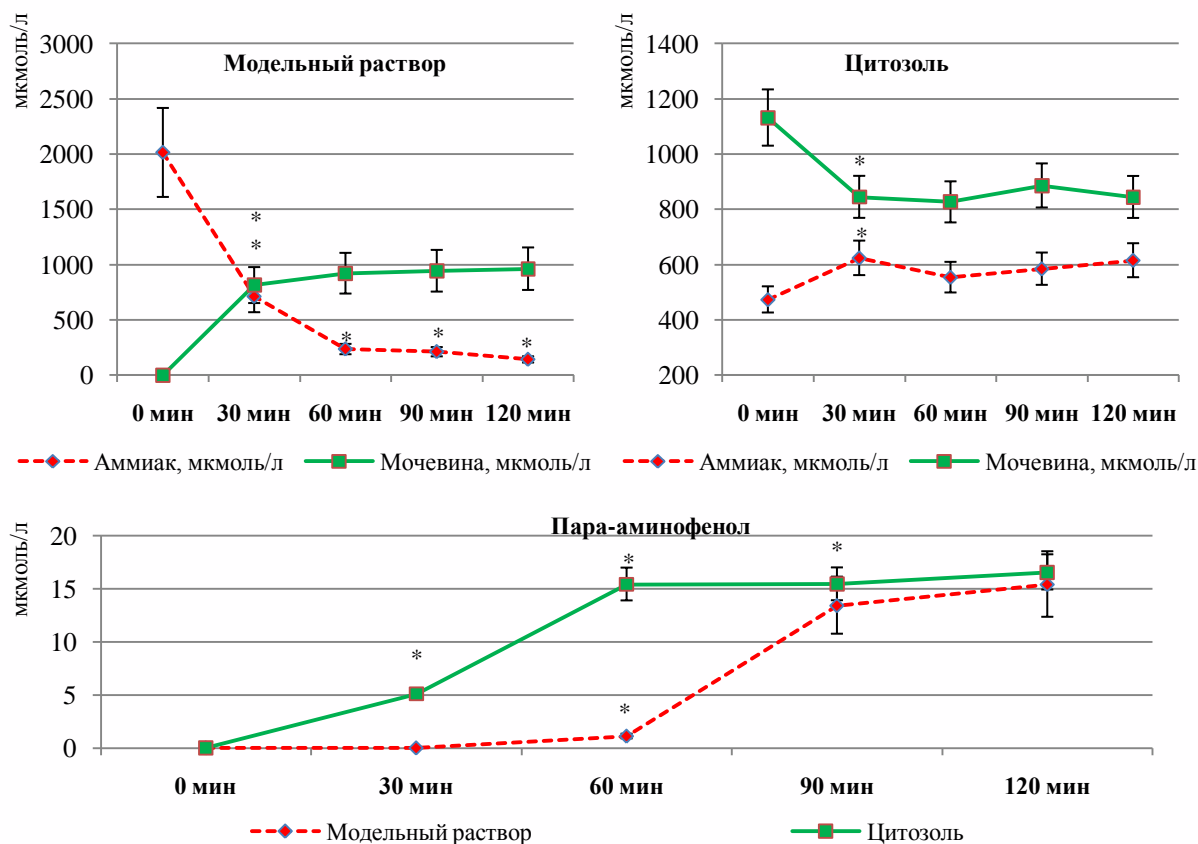
Все полученные результаты обрабатывались общепринятыми методами дескриптивной статистики и выражались в виде среднеарифметической (M) и ее стандартной ошибки (m). Статистическую значимость различий определяли с использованием парного критерия Вилкоксона, критерия Ньюмана – Кейлса, критерия Даннета. Для обработки результатов исследования использован пакет прикладных программ Statistica 8.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

Использование цитозоля печени, альбумина и донорской плазмы в качестве биоматериалов для аппарата «Биоискусственная печень» в модельном эксперименте

Цитозоль печени

В модельных экспериментах на аппарате «БИП» изучена динамика изменений концентраций аммиака, мочевины, анилина и пара-аминофенола в экстракорпоральном контуре аппарата «Биоискусственная печень» при использовании в качестве биодиализирующего раствора цитозоля печени с микросомальной и митохондриальной фракциями. Сохранение биологической активности митохондрий играет ключевую роль в эффективном функционировании как самих гепатоцитов, так и цитозоля при его использовании в аппарате «БИП». Полученные данные (рисунок 1) свидетельствуют о хорошей элиминации аммиака и его биотрансформации в мочевины в орнитинном цикле.



Примечание: n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, $p < 0,05$.

Рисунок 1 – Содержание мочевины, аммиака и пара-аминофенола в свежеприготовленном цитозоле печени свиньи и модельном растворе (0,9 %-й раствор хлорида натрия), $n = 5$

Через 30 минут после начала эксперимента из модельного раствора удалялось в среднем 65 % аммиака, через 60 минут – 88 %, а через 120 минут – 93 % аммиака, при этом содержание аммиака в цитозоле увеличилось через 30 минут в среднем на 30 % и в дальнейшем не изменялось. В то же время наблюдался рост концентрации мочевины в среднем от исходного содержания в цитозоле: через 30 минут – на 47 %, через 60 минут – на 54 %, 120 минут – на 60 %. Сохранение способности к синтезу мочевины является важным аргументом для использования цитозоля печени свиньи в экстракорпоральной системе детоксикации и коррекции метаболических нарушений, связанных с утратой детоксицирующей функции печени.

Тестирование микросомального окисления в цитозоле печени проводили по уровню пара-анилингидроксилазной активности. Эта реакция отражает активность изоформы CYP2E, осуществляющей окислительную биотрансформацию одноатомных и многоатомных спиртов, кетонов, четыреххлористого углерода, бензола, анилина, толуола и т. д. Низкая активность CYP2E ассоциируется с токсическим поражением печени органическими веществами (Сибиряк С. В., Вахитов В. А., Курчатова Н. Н. Цитохром P450 и иммунная система. Уфа: Гилем, 2003. 211 с.). Полученные нами результаты свидетельствуют об адекватной работе микросомального звена детоксикации, что выражалось в появлении в экстракорпоральном контуре продукта гидроксилирования анилина – пара-аминофенола в конечной концентрации 32,0 мкмоль/л (рисунок 1). Это служит доказательством значительного биотрансформирующего потенциала и высокой монооксигеназной активности цитозоля, его эффективного функционирования в качестве биодиализирующего раствора при использовании на аппарате «БИП» и способствует реализации детоксицирующей функции печени.

Раствор донорского альбумина

Сущность альбуминового диализа заключается в том, что происходит специфическое удаление накапливающихся при печеночной недостаточности не только водорастворимых, но и связанных с альбумином токсинов за счет избирательного мембранного транспорта без выведения полезных веществ. Перенос альбуминосвязанных токсических веществ через мембрану диализатора на акцептор, которым выступает донорский человеческий альбумин, является ключевым моментом метода (Mitzner S. R., Stange J., Klammt S. et al. Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigation // ASAIO J. 2009. Vol. 55, № 5. P. 498–502). Водорастворимые низкомолекулярные соединения удаляются по градиенту концентрации, как при обычном диализе (Кутепов Д. Е., Пасечник И. Н., Попов А. В. и др. Роль и место альбуминового диализа в лечении больных с печеночной недостаточностью // Анестезиология и реаниматология. 2010. № 2. С. 53–58). По полученным данным (таблица 1) уже через 30 минут после начала эксперимента из плазмы в среднем удалялось 56 % салицилата натрия, 62 % 2,4-ДНФ, 78 % аммиака, 66 % анилина и 64 % средних молекул. Через 60 минут – 65 % салицилата натрия, 73 % 2,4-ДНФ, 84 % аммиака, 75 % анилина и 77 % средних молекул.

В то же время наблюдалось пропорциональное увеличение концентрации данных соединений в растворе сывороточного альбумина, что свидетельствует о связывании токсических веществ альбумином в сравнении с обычным диализом. К концу эксперимента альбумином в среднем связалось 67 % салицилата натрия, 78 % 2,4-ДНФ, 92 % аммиака, 91 % анилина и 89 % средних молекул.

Полученные результаты могут быть интерпретированы исходя из современных представлений о физико-химических свойствах молекулы альбумина (Пашина Е. В., Золотавина М. Л. Альбумин в оценке эндогенной интоксикации // Наука и современность. 2014. № 33. С. 23–28).

Таблица 1 – Концентрации токсических веществ в модельном растворе и альбумине при осуществлении модельного эксперимента на аппарате «Биоискусственная печень» ($M \pm m$), $n = 5$

Концентрации индикаторных веществ		Время перфузии, мин					
		0	30	60	90	120	180
2,4-ДНФ, ммоль/л	МР	5,00 ± 0,20	1,92 ± 0,10*	1,30 ± 0,07*	1,36 ± 0,08	1,20 ± 0,04*	1,08 ± 0,05*
	ДР	0,00 ± 0,00	3,27 ± 0,10*	3,60 ± 0,26*	3,69 ± 0,15	3,71 ± 0,18	4,03 ± 0,20
Салицилат натрия, ммоль/л	МР	5,10 ± 0,30	2,18 ± 0,10*	1,70 ± 0,14*	1,91 ± 0,23	2,05 ± 0,21	1,60 ± 0,10*
	ДР	0,00 ± 0,00	3,07 ± 0,10*	3,37 ± 0,27	3,21 ± 0,14	3,23 ± 0,17	3,19 ± 0,20
Аммиак, ммоль/л	МР	1,20 ± 0,10	0,30 ± 0,02*	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,02*	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
	ДР	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,07*	0,72 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,60 ± 0,02*	0,62 ± 0,10
Анилин, ммоль/л	МР	2,80 ± 0,10	0,94 ± 0,10*	0,70 ± 0,04*	0,58 ± 0,10*	0,40 ± 0,02*	0,20 ± 0,01*
	ДР	0,00 ± 0,00	1,80 ± 0,06*	2,10 ± 0,12*	2,20 ± 0,15	2,35 ± 0,12	2,56 ± 0,20
Средние молекулы, у. е.	МР	2,20 ± 0,12	0,80 ± 0,03*	0,50 ± 0,04*	0,40 ± 0,04*	0,35 ± 0,02	0,24 ± 0,01*
	ДР	0,20 ± 0,01	1,15 ± 0,10*	1,39 ± 0,10*	1,46 ± 0,07	1,56 ± 0,07	1,78 ± 0,13*
Примечание: МР – модельный раствор: плазма; ДР – диализирующий раствор: раствор альбумина; М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, $p < 0,05$.							

Салицилат связывается со вторым центром молекулы альбумина по механизму, который характеризуется высоким аффинитетом и небольшим числом мест связывания. Это объясняет относительно невысокий эффект удаления салицилата в данном эксперименте: 67% против 98% элиминации 2,4-ДНФ. 2,4-ДНФ связывается с первым центром по механизму, который характеризуется слабым или средним сродством и высокой емкостью. Это и объясняет более высокую эффективность удаления 2,4-ДНФ по сравнению с салицилатом (Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотрансформация ядов. М. : Медицина, 1984. 217 с.).

Анилин, являясь достаточно сильным органическим основанием ($pK_b = 9,4$), при физиологическом значении pH находится практически полностью в ионизированном виде, поэтому наиболее эффективно удаляется в ходе модельного эксперимента, в том числе благодаря наличию гидрофобной части молекулы, позволяющей эффективно взаимодействовать со вторым центром связывания альбумина. Аммиак, являясь гидрофильным соединением и обладая малым размером молекул, хорошо удаляется с помощью альбуминового диализа. Полученные результаты хорошо согласуются с многочисленными литературными данными по удалению аммиака (Кутепов Д. Е. Использование экстракорпоральных методов лечения печеночной недостаточности // Казанский медицинский журнал. 2014. Т. 95, № 1. С. 75–79). Молекулы средней массы (МСМ) представляют собой группу соединений с молекулярной массой от 500 до 10 000, часть из которых может иметь как гидрофобную, так и гидрофильную природу, с разнообразными химическими свойствами. Поэтому здесь, по всей видимости, имеет место сложный механизм связывания с участием различных связывающих центров и отдельных участков полипептидной цепи альбумина, где решающую роль играет

третичная структура белка. Полученные данные демонстрируют высокий процент элиминации МСМ, которые являются маркерами эндогенной интоксикации.

Таким образом, связывание и транспорт сывороточным альбумином многих низкомолекулярных токсических веществ эндогенного и экзогенного происхождения делают возможным использование раствора альбумина в экстракорпоральных методах лечения при интоксикациях различной этиологии.

Для очистки и восстановления акцепторной способности раствор альбумина подвергали очистке путем карбоперфузии (таблица 2). Результаты, полученные в эксперименте по очистке использованного в диализном контуре 10 %-го раствора альбумина путем адсорбции на углеродном гемосорбенте, продемонстрировали хорошую степень очистки альбумина от индикаторных веществ.

Таблица 2 – Сорбция токсических веществ на гемосорбенте СКН-1 ($M \pm m$), $n = 5$

Время перфузии, мин	Концентрация в альбумине				
	2,4-ДНФ, мкмоль/л	Салицилат натрия, мкмоль/л	Аммиак, мкмоль/л	Анилин, мкмоль/л	Средние молекулы, у. е.
0	3611,00 \pm 217,30	4056,00 \pm 255,60	600,00 \pm 45,70	2560,00 \pm 170,50	1,627 \pm 0,150
15	2117,30 \pm 151,20 *	1725,20 \pm 123,20 *	282,20 \pm 23,50 *	1525,10 \pm 152,50 *	1,028 \pm 0,100 *
30	1536,70 \pm 102,40 *	1294,20 \pm 92,43 *	100,10 \pm 9,09 *	1024,80 \pm 78,77 *	0,827 \pm 0,070 *
60	1062,30 \pm 75,86 *	755,60 \pm 58,08 *	17,70 \pm 1,55 *	512,50 \pm 42,67 *	0,627 \pm 0,050 *
90	830,50 \pm 55,33 *	688,60 \pm 57,33	13,50 \pm 1,01 *	332,80 \pm 30,18 *	0,528 \pm 0,040 *
120	714,50 \pm 47,60 *	525,60 \pm 43,75 *	13,10 \pm 1,18	282,10 \pm 28,20	0,491 \pm 0,030
180	581,50 \pm 58,10 *	356,00 \pm 29,67 *	0,00 \pm 0,00 *	100,50 \pm 8,33 *	0,398 \pm 0,030 *
Примечание: М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, $p < 0,05$.					

Донорская плазма

Использование донорской плазмы в качестве ДР в модельном эксперименте на аппарате «БМП» практически не уступает по эффективности выведения индикаторных веществ альбуминовому диализу. Аналогично альбуминовому диализу основной массоперенос осуществляется в течение первых 30–60 минут эксперимента: через 30 минут в среднем удаляется 56 % 2,4-ДНФ, 53 % салицилата натрия, 75 % аммиака, 65 % анилина и 47 % молекул средней массы. Через 60 минут в среднем удаляется 62 % 2,4-ДНФ, 65 % салицилата натрия, 79 % аммиака, 73 % анилина и 57 % молекул средней массы. К 3-му часу эксперимента из перфузионного контура элиминировалось в среднем 69 % 2,4-ДНФ, 66 % салицилата натрия, 88 % аммиака, 90 % анилина и 76 % молекул средней массы (таблица 3).

Проведенные исследования показали, что использование в качестве ДР донорской плазмы по способности связывать токсины не уступает альбуминовому диализу, т. к. основным компонентом донорской плазмы является альбумин. Масса альбумина в плазме составляет 47–62 % от всех ее белков (Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотрансформация ядов. М. : Медицина, 1984. 217 с.). Таким образом, замена альбумина на донорскую плазму может увеличить доступность метода без снижения его эффективности.

Таблица 3 – Концентрации токсических веществ в модельном растворе и донорской плазме при осуществлении модельного эксперимента на аппарате «Биоискусственная печень» ($M \pm m$), $n = 5$

Концентрации индикаторных веществ		Время перфузии, мин					
		0	30	60	90	120	180
2,4-ДНФ, ммоль/л	МР	5,70 \pm 0,38	2,55 \pm 0,17*	2,18 \pm 0,22	2,11 \pm 0,15	1,90 \pm 0,17	1,83 \pm 0,18
	ДР	0,00 \pm 0,00	3,47 \pm 0,27*	3,70 \pm 0,25	3,82 \pm 0,27	3,98 \pm 0,40	4,06 \pm 0,41
Салицилат натрия, ммоль/л	МР	5,69 \pm 0,35	2,70 \pm 0,19*	2,05 \pm 0,20*	2,09 \pm 0,17	2,03 \pm 0,20	1,96 \pm 0,19
	ДР	0,00 \pm 0,00	3,09 \pm 0,28*	2,99 \pm 0,27	3,56 \pm 0,30	3,61 \pm 0,24	3,86 \pm 0,35
Аммиак, ммоль/л	МР	0,79 \pm 0,06	0,20 \pm 0,02*	0,17 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01*	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
	ДР	0,00 \pm 0,00	0,54 \pm 0,05*	0,61 \pm 0,05	0,63 \pm 0,06	0,67 \pm 0,07	0,70 \pm 0,06
Анилин, ммоль/л	МР	2,80 \pm 0,23	0,99 \pm 0,08*	0,76 \pm 0,06*	0,60 \pm 0,05*	0,40 \pm 0,03*	0,29 \pm 0,02*
	ДР	0,00 \pm 0,00	1,85 \pm 0,13*	2,08 \pm 0,20	2,26 \pm 0,16	2,43 \pm 0,19	2,55 \pm 0,96
Средние молекулы, у. е.	МР	0,82 \pm 0,07	0,44 \pm 0,03*	0,36 \pm 0,02*	0,30 \pm 0,01*	0,20 \pm 0,02*	0,20 \pm 0,01
	ДР	0,12 \pm 0,01	0,78 \pm 0,05*	0,82 \pm 0,08	0,87 \pm 0,06	0,90 \pm 0,07	0,76 \pm 0,05*
Примечание: МР – модельный раствор: плазма; ДР – диализирующий раствор: донорская плазма; М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, $p < 0,05$.							

В результате проведенных модельных исследований на экспериментальном образце аппарата «Б ИП» с использованием в качестве диализирующих растворов цитозоля печени, 10%-го раствора человеческого альбумина и донорской плазмы была показана эффективность их применения и возможность дальнейшего использования для дезинтоксикации и коррекции метаболических нарушений при печеночной недостаточности.

Сравнительное изучение диализа с использованием цитозоля печени и раствора альбумина на аппарате «Биоискусственная печень» с использованием низкопоточных и высокопоточных диализаторов в условиях модельного эксперимента

Проведенные исследования позволили изучить влияние низкопоточного и высокопоточного альбуминового и цитозольного диализа на функциональную активность цитозоля печени на экспериментальном образце аппарата «Биоискусственная печень», а также оценить соответствующую эффективность этих режимов в условиях цитозольного и альбуминового диализа.

При низкопоточном диализе основной массоперенос осуществляется в течение первых 30–60 минут (таблица 4). При использовании в качестве диализирующей жидкости физиологического раствора с наибольшей эффективностью удаляются гидрофильные индикаторные вещества, а связанные с альбумином гидрофобные вещества (2,4-ДНФ) практически не элиминируются. В условиях низкопоточного альбуминового диализа наблюдали высокую эффективность элиминирования гидрофобных веществ: 2,4-ДНФ, анилина и МСМ (процент удаления составил 34 %, 73 % и 66 % соответственно), а удаление гидрофильных индикаторных веществ (процент удаления 52–62%) было сопоставимо

с результатами, полученными при использовании в качестве диализирующей жидкости физиологического раствора.

Таблица 4 – Клиренс тестовых химических веществ при низкопоточном диализе с использованием различных диализирующих растворов, n = 5

В мл/мин ($M \pm m$)

Время, мин	2,4-ДНФ	Салицилат натрия	Аммиак	Анилин	Средние молекулы
Физиологический раствор					
30	0,41 ± 0,03	3,84 ± 0,32	3,60 ± 0,30	3,28 ± 0,22	3,38 ± 0,24
60	0,11 ± 0,01 *	0,26 ± 0,02 *	0,70 ± 0,05 *	0,72 ± 0,05 *	1,10 ± 0,11 *
120	0,08 ± 0,01 *	0,02 ± 0,01 *	0,20 ± 0,02 *	0,47 ± 0,03 *	0,20 ± 0,02 *
180	0,02 ± 0,01 *	0,09 ± 0,01 *	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01 *	0,20 ± 0,02
Раствор альбумина					
30	5,96 ± 0,43	4,13 ± 0,41	3,23 ± 0,27	4,95 ± 0,50	5,36 ± 0,54
60	0,35 ± 0,03 *	0,79 ± 0,05 *	0,93 ± 0,07 *	2,90 ± 0,26 *	0,73 ± 0,07 *
120	0,35 ± 0,03	0,23 ± 0,02 *	0,44 ± 0,03 *	2,42 ± 0,16 *	0,42 ± 0,03 *
180	0,20 ± 0,02 *	0,01 ± 0,001 *	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,04 *	0,07 ± 0,01 *
Цитозоль печени					
30	3,91 ± 0,33	4,24 ± 0,33	5,41 ± 0,45	4,97 ± 0,36	4,07 ± 0,31
60	0,34 ± 0,02 *	0,73 ± 0,06 *	0,88 ± 0,07 *	1,01 ± 0,07 *	1,12 ± 0,09 *
120	0,28 ± 0,03 *	0,02 ± 0,01 *	0,28 ± 0,02 *	0,22 ± 0,01 *	0,32 ± 0,03 *
180	0,21 ± 0,02 *	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,02 *	0,18 ± 0,02 *	0,05 ± 0,01 *
Примечание: М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, p < 0,05.					

На начальном этапе с наибольшей скоростью удаляются молекулы аммиака и анилина, имеющие небольшой размер и находящиеся в ионизированном виде, поэтому легко проходящие сквозь мембрану диализатора. Более медленно, но не менее эффективно идет удаление 2,4-ДНФ, салицилата натрия и МСМ. Это может быть связано с особенностями взаимодействия данных маркеров со связывающими центрами молекулы альбумина: высокий аффинитет и малое число связывающих мест у салицилата, слабый аффинитет и высокая емкость у 2,4-ДНФ (Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотрансформация ядов. М.: Медицина, 1984. 217 с.). Данные взаимодействия приводят к конформационной перестройке молекулы альбумина. МСМ, в силу разнообразия их молекулярной массы и природы, взаимодействуют с молекулой альбумина еще более сложным образом с реализацией разных механизмов и связыванием с помощью различных участков полипептидной цепи альбумина. Полученные данные демонстрируют высокую скорость элиминации всех индикаторных веществ, что обеспечивает высокий процент удаления всех маркеров из модельного раствора в ходе эксперимента на экспериментальном образце аппарата «БИП».

Эффективность низкопоточного цитозольного диализа существенно превышает показатели диализа с использованием физиологического раствора, но по некоторым параметрам уступает альбуминовому диализу. Вместе с тем наиболее эффективное удаление аммиака (процент удаления 64%) достигается при использовании цитозоля печени в качестве ДР. Таким образом, сравнительная характеристика клиренсов тестовых химических соединений при низкопоточном диализе демонстрирует потенциальную возможность проведения избирательной элиминации в зависимости от характера интоксикации и/или особенностей течения заболевания.

Результаты экспериментов по высокопоточному диализу с использованием альбумина в качестве ДР свидетельствуют о высокой скорости удаления исследуемых маркерных соединений (таблица 5). Были получены более высокие значения клиренса по сравнению с низкопоточным альбуминовым диализом: клиренс 2,4-ДНФ, салицилата натрия, аммиака, анилина и МСМ через 30 минут увеличивался в среднем на 44 %, 35 %, 44 %, 15 % и 16 % соответственно. Использование высокопоточных диализаторов (High-Flux) с большим размером пор позволяет выводить из плазмы крови 60–70 % низко- и среднемолекулярных веществ за первые 30 минут контакта с 10 %-м раствором альбумина, что может быть связано с более эффективным лигандным переносом через мембрану веществ, связанных с сывороточным альбумином.

Таблица 5 – Клиренс тестовых химических веществ при высокопоточном диализе с использованием различных диализирующих растворов, n = 5

В мл/мин (М ± m)

Время, мин	2,4-ДНФ	Салицилат натрия	Аммиак	Анилин	Средние молекулы
Раствор альбумина					
30	10,70 ± 0,89	6,30 ± 0,57	5,80 ± 0,48	5,70 ± 0,38	6,40 ± 0,53
60	0,30 ± 0,02 *	0,40 ± 0,03 *	0,70 ± 0,05 *	2,20 ± 0,18 *	0,70 ± 0,06 *
120	0,20 ± 0,02 *	0,20 ± 0,01 *	0,70 ± 0,07	0,40 ± 0,03 *	0,40 ± 0,03 *
180	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,70 ± 0,06	0,03 ± 0,01 *	0,20 ± 0,01 *
Цитозоль печени					
30	2,70 ± 0,23	4,55 ± 0,46	5,47 ± 0,50	5,60 ± 0,37	2,94 ± 0,21
60	0,69 ± 0,07 *	0,67 ± 0,04 *	0,25 ± 0,02 *	1,25 ± 0,08 *	0,29 ± 0,02 *
120	0,19 ± 0,02 *	0,02 ± 0,01 *	0,07 ± 0,01 *	0,27 ± 0,02 *	0,20 ± 0,01 *
180	0,21 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,01 *	0,01 ± 0,003 *
Примечание: М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от предыдущего уровня, p < 0,05.					

Анализ полученных данных по высокопоточному диализу с использованием в качестве ДР цитозоля печени не показал существенных отличий в динамике удаления тестовых химических соединений из плазмы или их связывания с цитозолем по сравнению с низкопоточным диализом (таблица 5).

В ходе исследования получены данные о влиянии режимов диализа на функциональную активность цитозоля печени. В течение всей процедуры низкопоточного диализа цитозоль сохранял высокую функциональную активность, на что указывают стабильные активности ферментов (таблица 6): увеличение активности дегидрогеназы

диметиланилина и 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазы отражает усиление активности микросомальной системы окисления и биотрансформации ксенобиотиков.

Таблица 6 – Функциональная активность цитозоля печени крысы при различных видах диализа плазмы с тестовыми химическими соединениями ($M \pm m$), $n = 5$

Измеряемый показатель	0 мин	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
Низкопоточный диализ					
ДМА, нмоль/мин/мг	21,33 \pm 0,99	13,37 \pm 1,22*	19,22 \pm 1,37	20,51 \pm 1,71	20,17 \pm 1,55
2,6-ДХФИФ, нмоль/мин/мг белка	28,56 \pm 3,01	25,69 \pm 2,57	34,33 \pm 3,43	34,54 \pm 2,66*	34,71 \pm 2,48*
АЛТ, Ед/л	121,40 \pm 9,85	114,50 \pm 11,45	91,80 \pm 7,65*	115,10 \pm 7,67	107,10 \pm 7,65
Мочевина, ммоль/л	4,01 \pm 0,19	3,60 \pm 0,26	4,40 \pm 0,29	7,70 \pm 0,51*	7,50 \pm 0,51*
Общий белок, мг/мл	8,90 \pm 1,47	9,30 \pm 0,78	6,90 \pm 0,58	6,70 \pm 0,56*	6,50 \pm 0,49*
Высокопоточный диализ					
ДМА, нмоль/мин/мг	18,19 \pm 1,82	9,04 \pm 0,75*	7,65 \pm 0,70*	8,76 \pm 0,88*	6,95 \pm 0,46*
2,6-ДХФИФ, нмоль/мин/мг белка	34,91 \pm 2,49	19,83 \pm 1,32*	18,33 \pm 1,41*	19,18 \pm 1,37*	19,88 \pm 1,99*
АЛТ, Ед/л	446,10 \pm 31,86	114,20 \pm 9,50*	269,10 \pm 20,69*	73,30 \pm 6,11*	47,10 \pm 3,93*
Мочевина, ммоль/л	0,47 \pm 0,03	2,10 \pm 0,16*	2,40 \pm 0,20*	2,50 \pm 0,25*	3,90 \pm 0,30*
Общий белок, мг/мл	7,43 \pm 0,74	14,12 \pm 1,41*	14,80 \pm 1,06*	14,35 \pm 1,44*	14,26 \pm 1,10*
Примечание: М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; * – статистически значимые отличия от исходного уровня (0 мин), $p < 0,05$.					

Отсутствие изменений активности АЛТ в процессе эксперимента, с одной стороны, свидетельствует о полноте гомогенизации и эффективности дифференциального центрифугирования гомогената печени, с другой стороны – является индикатором сохранности ферментативных систем цитозоля печени. Почти двукратное увеличение концентрации мочевины свидетельствует об усилении биосинтеза мочевины и коррелирует с изменением содержания аммиака в обоих контурах. Уменьшение концентрации общего белка через час после начала диализа можно объяснить усилением в этот период реакций протеолиза и последующей стабилизацией этого процесса.

При высокопоточном режиме диализа, в отличие от низкопоточного, наблюдалось почти двукратное снижение активности деметилазы диметиланилина, 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазы и значительные колебания в активности АЛТ (таблица 6). Такие изменения активности ферментов могут быть связаны с увеличенной проницаемостью мембран для различных низко- и среднемолекулярных соединений плазмы крови, способных вызывать аллостерическое ингибирование белковых молекул. В то же время, как и при низкопоточном диализе, наблюдалось увеличение концентрации мочевины в процессе контакта с плазмой крови: через 30 минут содержание мочевины увеличивается в 4,5 раза, а через 180 минут – в 8,3 раза, что свидетельствует о способности цитозоля включать экзогенный аммиак в синтез мочевины. О том, что увеличение концентрации мочевины в цитозоле не является результатом диализа мочевины из плазмы, свидетельствует отсутствие равновесных концентраций через 180 минут (таблица 6).

Клинические исследования терапевтической эффективности метода альбуминовой экстракорпоральной детоксикации на аппарате «БИП»

Результаты проведенного клинического исследования на экспериментальном образце аппарата «БИП» продемонстрировали способность альбуминового диализа восстанавливать нарушенные функции печени. В ходе исследования наблюдали статистически значимое снижение активностей трансаминаз, щелочной фосфатазы и уменьшение содержания билирубина – маркера альбумин-связанных токсинов после процедуры альбуминового диализа (таблица 7). В процессе проведения терапии значительно снижался уровень аммиака – одного из основных клинко-лабораторных показателей, характеризующих тяжесть ОПН, что подтверждалось уменьшением проявлений энцефалопатии и улучшением неврологического статуса у большинства пациентов.

Таблица 7 – Влияние альбуминового диализа на биохимические показатели сыворотки крови пациентов с ОПН, n = 20

Показатель		М	m	P
АЛТ, Ед/л	До	179,85	33,27	0,00014
	После	106,05	16,04	
АСТ, Ед/л	До	152,35	35,96	0,00016
	После	86,25	9,38	
Креатинин, мкмоль/л	До	167,60	22,43	0,34
	После	164,60	24,10	
Аммиак, мкмоль/л	До	133,60	7,53	0,00009
	После	44,63	1,82	
Мочевина, ммоль/л	До	11,36	1,35	0,71
	После	11,88	1,66	
Общий белок, г/л	До	66,20	1,73	0,97
	После	66,55	1,59	
Альбумины, г/л	До	32,00	1,01	0,89
	После	31,38	1,05	
Билирубин общий, мкмоль/л	До	295,00	53,30	0,00016
	После	219,10	46,60	
Билирубин прямой, мкмоль/л	До	208,60	32,60	0,00009
	После	144,70	30,70	
Билирубин непрямой, мкмоль/л	До	86,40	24,40	0,25
	После	75,30	17,60	
ЩФ, Ед/л	До	726,10	163,40	0,00009
	После	428,90	123,20	
Амилаза, Ед/л	До	100,90	5,10	0,26
	После	140,30	43,70	
Глюкоза, ммоль/л	До	4,90	0,20	0,04
	После	5,40	0,10	
Примечание: М – среднеарифметическая величина; m – ее стандартная ошибка; n – число экспериментов; р – показатель достоверности различий параметров до и после альбуминового диализа по парному критерию Вилкоксона; р < 0,05 – статистически значимые отличия.				

Поддержание синтетической функции печени демонстрирует статистически значимое повышение уровня глюкозы после альбуминовой терапии, что свидетельствует о нормализации углеводного обмена, который при ОПН претерпевает выраженные нарушения. У всех пациентов после сеанса отмечалась стабилизация состояния; побочные

эффекты, связанные с процедурой, отсутствовали. Настоящими исследованиями показана возможность успешного использования метода альбуминового диализа на аппарате «Б ИП» при лечении больных с ОПН. Таким образом, данный метод может быть рекомендован к дальнейшим клиническим испытаниям и внедрению в практику интенсивной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования изучены механизмы реализации жизненно важных функций печени (детоксицирующей и мочевинообразовательной) в условиях экстракорпорального контура аппарата «Биоискусственная печень» при эфферентной терапии острой печеночной недостаточности. В серии модельных экспериментов дана сравнительная характеристика эффективности цитозольного и альбуминового диализа. Клинические исследования на экспериментальном образце аппарата «Биоискусственная печень» продемонстрировали высокую эффективность альбуминового диализа в коррекции нарушений азотистого, пигментного и углеводного обмена при острой печеночной недостаточности.

Перспективы разработки темы связаны с дальнейшей оптимизацией, усовершенствованием конструкции аппарата «Б ИП» и проведением экспериментально-клинических исследований, что позволит создать multifunctional аппарат для очищения крови с возможностью проведения клеточного диализа, гемо- и ультрафильтрации, гемо- и плазмасорбции.

ВЫВОДЫ

1. В ходе цитозольного диализа происходит снижение содержания аммиака на 93 %, увеличение содержания мочевины на 60 % в модельном и диализирующем растворах, что свидетельствует о биотрансформации аммиака ферментами орнитинового цикла в диализном контуре аппарата «Биоискусственная печень».

2. В ходе цитозольного диализа происходит непрерывное гидроксирование анилина (концентрация пара-аминофенола в системе достигает 32 мкмоль/л), что говорит о сохранении биологической активности микросомальной системы цитозоля и способствует реализации детоксицирующей функции печени.

3. При альбуминовом и плазменном диализе на аппарате «Биоискусственная печень» происходит эффективное специфическое удаление как водорастворимых (аммиак, салицилат натрия), так и связанных с альбумином гидрофобных (2,4-динитрофенол, молекулы средней массы, анилин) маркерных токсических веществ экзо- и эндогенной природы на 70–90 % от исходного уровня.

4. Использование высокопоточных диализаторов при цитозольном диализе приводит к снижению активности микросомальных ферментов: деметилазы диметиланилина – в 2,6 раза, 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазы – в 1,75 раза и к уменьшению скорости мочевинообразования в 1,4 раза по сравнению с низкопоточным диализом.

5. Применение высокопоточных диализаторов при альбуминовом диализе обеспечивает более эффективный лигандный перенос токсических веществ через мембрану: клиренс 2,4-динитрофенола возрастает в 1,8 раза, молекул средней массы – в 1,2 раза, салицилата натрия – в 1,5 раза, аммиака – в 1,8 раза, анилина – в 1,15 раза по сравнению с низкопоточным диализом.

6. Проведение процедуры альбуминового диализа у пациентов с острой печеночной недостаточностью на экспериментальном образце аппарата «Биоискусственная печень» позволяет существенно ограничить выраженность клинико-лабораторных проявлений ОПН: уровни билирубинемии, аммониемии и гликемии, активность органоспецифических ферментов.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Полевщикова, Е. Е.** Исследование эффективности альбуминового диализа при острой печеночной недостаточности на экспериментальном образце аппарата «Биоискусственная печень» / Е. Е. Полевщикова // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. ХСVI, № 5. – С. 768–771.
2. Рябинин, В. Е. Аппарат для альбуминовой и цитозольной детоксикации / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, В. И. Супрун, А. П. Егоров // Медицинская техника. – 2014. – № 3. – С. 14–17.
3. Рябинин, В. Е. Изучение возможности использования цитозоля печени свиней в качестве биоматериала для экстракорпоральной детоксикации при печеночной недостаточности / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, С. А. Пушкарев, П. Н. Попков, Е. Л. Куренков, А. А. Стасюк, А. Ю. Дубасов, С. И. Гробовой, Р. И. Мухаметжанова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10, ч. 1. – С. 125–129.
4. Рябинин, В. Е. Разработка систем искусственного жизнеобеспечения и клеточной терапии для лечения заболеваний печени / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, П. Н. Попков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 2 (39). – С. 135–136.
5. Рябинин, В. Е. Использование аппарата «Биоискусственная печень» при лечении печеночной недостаточности / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, А. Ю. Тюрин, В. И. Супрун // Медицинская наука и образование Урала. – 2008. – № 2 (52). – С. 69–72.

Патенты

1. Пат. 56191 Российская Федерация. Аппарат для диализа / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**. – № 2005125912; заявл. 15.08.2005; опубл. 10.09.2006.

Статьи, тезисы и материалы докладов всероссийских и международных конференций, конгрессов, монографии

1. **Полевщикова, Е. Е.** Изучение эффективности различных режимов диализа с использованием в качестве диализирующего раствора печени и раствора альбумина на аппарате «Биоискусственная печень» в условиях модельного эксперимента / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин // Символ науки. – 2016. – № 8, ч. 2. – С. 30–34.
2. Рябинин, В. Е. Разработка multifункционального аппарата «Биоискусственная печень» с соответствующими биоматериалами / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, С. А. Пушкарев, П. Н. Попков, А. А. Стасюк, А. Ю. Дубасов, Р. И. Мухаметжанова, М. Соколов // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». – Москва, 2014. – С. 520.
3. **Полевщикова, Е. Е.** Результаты клинического исследования лечения печеночной недостаточности на аппарате «Биоискусственная печень» / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин, Д. А. Козочкин // I Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса. – Москва, 2013. – С. 204.
4. Рябинин, В. Е. Экспериментальное изучение эффективности аппарата «Биоискусственная печень» и экстракта фетальной печени человека для лечения заболеваний печени / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, С. Н. Краснопеева, П. Н. Попков // Международная интернет-конференция «Биотехнология. Взгляд в будущее» : сборник трудов. – Казань : Изд-во Казанский университет, 2012. – С. 237–239.
5. Рябинин, В. Е. Использование аппарата «Биоискусственная печень» при лечении печеночной недостаточности / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, А. Ю. Тюрин, В. И. Супрун // Российская конференция, посвященная 80-летию со дня рождения

Р. И. Лифшица «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». – Челябинск, 2009. – С. 150–152.

6. Рябинин, В. Е. Возможности лечения печеночной недостаточности при использовании аппарата «Биоискусственная печень» / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, А. Ю. Тюрин, В. И. Супрун // Вестник Челябинской областной клинической больницы. – 2008. – № 1 (1). – С. 44–47.

7. Рябинин, В. Е. Разработка систем искусственного жизнеобеспечения и заместительной клеточной терапии при заболеваниях печени / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, П. Н. Попков, С. Н. Краснопеева // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине». – Курган, 2007. – С. 102–103.

8. Рябинин, В. Е. Разработка и внедрение в клиническую практику технологии субклеточного и белкового диализа / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, П. Н. Попков, С. Н. Краснопеева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине». – Курган, 2007. – С. 101–102.

9. **Полевщикова, Е. Е.** Альбуминовый диализ: терапия острой печеночной недостаточности / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин, А. Ю. Тюрин, И. И. Долматов // Двенадцатая Российская конференция «Гепатология сегодня». – Москва, 2007. – С. 5.

10. **Полевщикова, Е. Е.** Эффективность использования альбумина и донорской плазмы в модельных экспериментах на аппарате «Биоискусственная печень» / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин, А. Г. Томилов, А. П. Егоров, В. А. Кукса, В. И. Супрун // Тезисные материалы II итоговой научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию образования Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск : Изд-во ЧелГМА, 2004. – С. 72–73.

11. **Полевщикова, Е. Е.** «Биоискусственная печень»: эффективность и безопасность использования альбумин-диализа в режиме рециркуляции через углеродный сорбент / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин, А. Г. Томилов, А. П. Егоров, В. А. Кукса, В. И. Супрун // Известия Челябинского научного центра. – 2004. – Спец. вып. 25. – С. 40–44.

12. Рябинин, В. Е. Система поддержки печени, основанная на экстракорпоральной очистке крови и технике биоискусственной печени / В. Е. Рябинин, **Е. Е. Полевщикова**, С. И. Гробовой, В. И. Супрун // II Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2003. – Ч. 1. – С. 151.

13. Рябинин, В. Е. Использование экстракорпоральных систем детоксикации и экстракта фетальной печени человека для лечения заболеваний печени / В. Е. Рябинин, С. И. Гробовой, **Е. Е. Полевщикова**, Е. Л. Куренков, Л. Ю. Суханова, С. Н. Краснопеева, А. М. Малышева, П. Н. Попков // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 50-летию Читинской государственной медицинской академии. – Чита, 2003. – С. 356–357.

14. **Полевщикова, Е. Е.** Экстракорпоральное удаление некоторых экзогенных и эндогенных токсинов с использованием донорского альбумина на аппарате «Биоискусственная печень» и последующая его очистка на углеродном гемосорбенте / Е. Е. Полевщикова, В. Е. Рябинин // Биохимия: от исследования молекулярных механизмов – до внедрения в клиническую практику и производство : материалы межрегиональной конференции биохимиков Урала, Западной Сибири и Поволжья / под ред. В. П. Твердохлиба. – Оренбург, 2003. – С. 500–501.

15. Рябинин, В. Е. Исследование свойств цитозоля печени на модельной установке «Биологическая вспомогательная печень» / В. Е. Рябинин, С. И. Гробовой, **Е. Е. Полевщикова** // Омский научный вестник. – 2002. – Вып. 21, прил. – С. 31–33. – Актуальные проблемы биохимии патологических процессов.

Список сокращений и условных обозначений

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АХЭ – ацетилхолинэстераза
«БИП» – «Биоискусственная печень»
ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза
2,4-ДНФ – 2,4-динитрофенол
2,6-ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктаза
ДМА – деметилаза диметиланилина
ДР – диализирующий раствор
КФК – креатинфосфокиназа
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
МР – модельный раствор
МСМ – молекулы средней массы
ОПН – острая печеночная недостаточность
ЩФ – щелочная фосфатаза

На правах рукописи

Полевщикова Елена Евгеньевна

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
АЛЬБУМИНОВОГО И ЦИТОЗОЛЬНОГО ДИАЛИЗА
НА АППАРАТЕ «БИОИСКУССТВЕННАЯ ПЕЧЕНЬ»**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2017

Подписано к печати 18.05.2017
Формат 60х84 1/16 Объем 1,0 уч.-изд.л
Заказ № 715. Тираж 100 экз.
Отпечатано на ризографе в типографии «Вера»
454091, г. Челябинск, ул. Свободы 22, офис 2